

RESONANT OPTICAL CAVITIES FOR HIGH-SENSITIVITY, HIGH-THROUGHPUT BIOLOGICAL SENSORS AND METHODS

Publication number: JP2003515737 (T)

Publication date: 2003-05-07

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- **international:** G01N21/25; G01N21/27; G01N21/55; G01N21/64; G01N33/543; G01N33/566; G01N37/00; G01N21/25; G01N21/55; G01N21/64; G01N33/543; G01N33/566; G01N37/00; (IPC1-7): G01N21/27; G01N21/64; G01N33/543; G01N33/566; G01N37/00

- **European:** G01N21/64H; G01N21/64P2; G01N21/64P8; Y01N6/00

Application number: JP20010542173T 20001012

Priority number(s): US19990159366P 19991014; WO2000US41138 20001012

Also published as:

WO0140757 (A2)

WO0140757 (A3)

EP1221051 (A2)

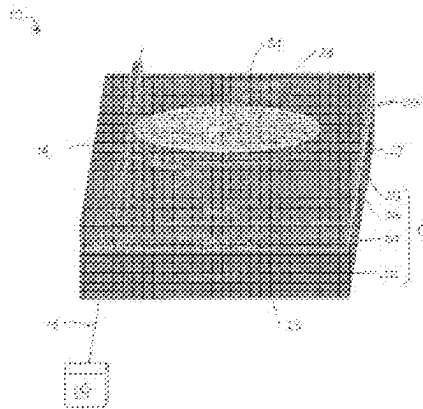
AU4503201 (A)

CA2384977 (A1)

Abstract not available for JP 2003515737 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0140757 (A2)**

Biosensors including resonant optical cavities. The resonant optical cavities are shaped so as to generate whispering gallery modes, which increase the quality factors of the cavities and facilitate the detection of analytes in a sample with enhanced sensitivity. The sizes of the resonant optical cavities facilitate their use in biosensors that include arrays of sensing zones. Accordingly, the resonant optical cavities may be used in high-density sensing arrays that can be read in real-time and in parallel. Thus, the resonant optical cavities are useful for detecting small concentrations of samples in real-time and with high throughput. Different embodiments of the biosensors are also disclosed, as are methods for using the biosensors.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-515737

(P2003-515737A)

(43) 公表日 平成15年5月7日(2003.5.7)

(51) Int.Cl. ¹	識別記号	P I	チーシート*(参考)
G 0 1 N 21/27 21/64		G 0 1 N 21/27 21/64	C 2 G 0 4 3 F 2 G 0 5 9 G
33/543 33/566	5 9 5	33/543 33/566	5 9 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-542173(P2001-542173)
(86) (22) 出願日 平成12年10月12日(2000.10.12)
(85) 翻訳文提出日 平成14年4月12日(2002.4.12)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 4 1 1 3 8
(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 4 0 7 5 7
(87) 国際公開日 平成13年6月7日(2001.6.7)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 5 9 , 3 6 6
(32) 優先日 平成11年10月14日(1999.10.14)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

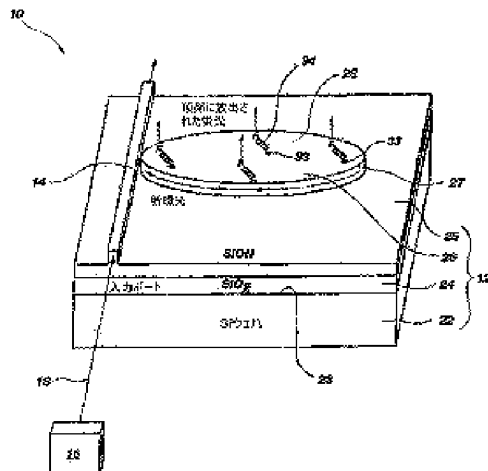
(71) 出願人 ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ
ファウンデーション
アメリカ合衆国・ユタ州 84108・ソルト
レイク シティ・スイート 110・アラ
ビーン ドライブ 615
(72) 発明者 ブレア、スティーブン エム.
アメリカ合衆国 84121 ユタ州 ソルト
レイクシティ イースト 7590 サウス
3434
(74) 代理人 弁理士 恩田 博宣 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高感度で高スループットの生物学的センサおよび方法のための共振式光キャビティ

(57) 【要約】

共振式光キャビティを備えるバイオセンサ。上記共振式光キャビティはウィスパーリング・ギヤリモードを生成すべき形状とされる。該モードは、該キャビティのクオリティ・ファクタを増大すると共に、サンプル内の被検体の検出を増進感度を以て促進する。上記共振式光キャビティのサイズによれば、検知領域の配列を含むバイオセンサにおける該キャビティの使用が容易となる。従って、上記共振式光キャビティはリアルタイムで並列に読み取られ得る高密度センサ配列にて使用され得る。故に上記共振式光キャビティは、リアルタイムで高スループットにて低濃度のサンプルを検出する上で有用である。バイオセンサの種々の実施形態、並びに、バイオセンサの使用方法も開示される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 共鳴式光キャビティ (resonant optical cavity) を備えたバイオセンサ。

【請求項2】 前記共鳴式光キャビティはほぼ平面である表面を備える請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記共鳴式光キャビティは円筒状である請求項2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 前記共鳴式光キャビティはほぼ球状である請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項5】 前記共鳴式光キャビティは少なくとも約 10^4 のクオリティ・ファクタを有する請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項6】 前記共鳴式光キャビティは少なくとも約 10^7 のクオリティ・ファクタを有する請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項7】 前記共鳴式光キャビティは約 $10\mu\text{m}$ ～約 $100\mu\text{m}$ の直径を有する請求項3記載のバイオセンサ。

【請求項8】 前記共鳴式光キャビティは約 1mm ～約 10mm の直径を有する請求項3記載のバイオセンサ。

【請求項9】 共鳴式光キャビティの配列を備える請求項7記載のバイオセンサ。

【請求項10】 前記共鳴式光キャビティの表面の近傍に該共鳴式光キャビティ内に電磁放射線を送出するように構成された伝播ポートを更に備えて成る請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項11】 前記伝播ポートは、複数の共鳴式光キャビティ内に電磁放射線を送出すべく構成された導波路分配ネットワークを備え、該導波路分配ネットワークはバス・ネットワークおよび組合せツリー・バス・ネットワークの少なくとも一方を有する請求項10記載のバイオセンサ。

【請求項12】 前記共鳴式光キャビティの表面上または同表面に隣接して固定化された少なくとも1つの捕捉用基質を更に備えて成る請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項13】 前記表面上または同表面に隣接して固定化された複数の種類の捕捉用基質を備える請求項12記載のバイオセンサ。

【請求項14】 前記複数の種類の捕捉用基質は前記表面の異なる領域上または同領域に隣接して固定化される請求項13記載のバイオセンサ。

【請求項15】 被検体に対する、または、該被検体と競合する分子に対する前記少なくとも一種類の捕捉用基質の結合を検出すべく構成されたセンサを更に備えて成る請求項12記載のバイオセンサ。

【請求項16】 前記センサは質量および蛍光の少なくとも一方を検出すべく構成される請求項15記載のバイオセンサ。

【請求項17】 前記共鳴式光キャビティは二重共鳴である請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項18】 前記共鳴式光キャビティは、ウィスバリング・ギャラリモードを生成し得ると共に、微細加工共鳴式光キャビティおよびバルク共鳴式光キャビティの少なくとも一方を備え、且つ、

当該バイオセンサは、

電磁放射線源と、

上記共鳴式光キャビティ内に電磁放射線を送出すべく上記電磁放射線源と連通し、かつ上記共鳴式光キャビティの表面の近傍に配設された伝播ポートと、

上記共鳴式光キャビティの実質的に無欠陥の表面上または同表面に隣接して固定化された少なくとも一種類の捕捉用基質と、

上記表面に対して固定化された分子の質量、および、上記表面に対して固定化された分子からの蛍光の少なくとも一方を検出すべく構成されたセンサと、

を更に備えて成る請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項19】 サンプル内の少なくとも一種類の被検体を検出する方法であって、

共鳴式光キャビティの表面に対して固定化された少なくとも一種類の捕捉用基質を少なくとも一種類の被検体に対して触れさせるように上記表面に対してサンプルを塗付する工程と、

上記共鳴式光キャビティ内に電磁放射線を導入する工程と、

上記少なくとも一種類の捕捉用基質に対する上記少なくとも一種類の被検体の結合を検出する工程とを備える方法。

【請求項20】 前記塗付工程は、蛍光的に標識された被検体と、前記少なくとも一種類の捕捉用基質上の結合部位に対して少なくとも一種類の被検体と競合する蛍光的に標識された分子との少なくとも一方を前記表面に塗付する工程から成る請求項19記載の方法。

【請求項21】 前記検出工程は、一光子吸収および二光子吸収の少なくとも一方を採用して蛍光タグの励起を検出する工程から成る請求項20記載の方法。

【請求項22】 前記共鳴式光キャビティの二重共鳴により前記電磁放射線を光リサイクル (photo-recycling) する工程を更に備えて成る請求項19記載の方法。

【請求項23】 前記検出工程は質量検知工程から成る請求項19記載の方法。

【請求項24】 前記質量検知工程は、キャビティの離調により屈折率を測定する工程から成る請求項23記載の方法。

【請求項25】 前記検出工程は、ナノモル以下またはピコモル以下の少なくとも一方である少なくとも一種類の被検体の濃度により行われる請求項19記載の方法。

【請求項26】 共鳴式光キャビティの作製方法であって、
基板を配備する工程と、
上記基板上に対照層を作製する工程と、
共鳴式光キャビティを該対照層上に形成する工程とを備え、前記共鳴式光キャビティは前記対照層の屈折率の少なくとも約1.5倍の屈折率を有する作製方法。

【請求項27】 前記基板を配備する前記工程は、ガラス、石英および半導体材料の少なくとも1つを配備する工程から成る請求項26記載の方法。

【請求項28】 前記共鳴式光キャビティを形成する前記工程は、
前記対照層上に酸化ケイ素および酸窒化ケイ素の少なくとも一方から成る材料

層を形成する工程と、

上記材料層をパターンニングして該材料層から少なくとも1つの円筒状共鳴式光キャビティを形成する工程とから成る請求項26記載の方法。

【請求項29】 ガラスおよび石英の少なくとも一方から成るバルク円筒状基板を配備する工程と、

上記バルク円筒状基板の端部を研磨する工程と、

上記研磨端部にイオン交換導波路を形成する工程とを備える共鳴式光キャビティの作製方法。

【請求項30】 前記形成工程は、前記研磨端部に対してナトリウムイオンおよびカリウムイオンの少なくとも一方を注入する工程から成る請求項29記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は光学バイオセンサに関し、特に高スループットの光学バイオセンサに関する。より詳細には、本発明の光学バイオセンサは、該光学バイオセンサの感度を強化するウィスパーリング・ギャラリモード (whispering gallery mode) の使用を促進する構造を含む。本発明はまた、光学バイオセンサを作製する方法、ならびに、斯かる光学バイオセンサを使用する診断方法にも関する。

【0002】

発明の背景

多くの医学的疾患の処置に対しては、早期で正確な診断が重要である。抗体、遺伝子、薬物、ペプチド、細胞および問題となる他の生体分子を検出すると共にDNA分子の配列を決定するという臨床用途に対しては、高スループットの生体検知 (biosensing) が活発で成長しつつある研究分野である。

【0003】

現在、生体検知に関して研究努力が為されている2つの主な光学的手法は、セグメント化されたエバネッセント導波路バイオセンサ (segmented evanescent waveguide biosensor) の使用と、いわゆる“バイオチップ (biochip)”の使用であるが、これらは基本的に、そこに捕捉用生体分子が固着される微細加工された基板 (microfabricated substrates) を備える。

【0004】

光導波路は、低サンプル濃度で高スループットのイムノアッセイ (IA) および分子診断検定 (molecular diagnostic assay) (MDx) で使用されることが多い。セグメント化された導波路が使用される場合、導波路は1つ以上の波長の電磁放射線 (たとえば光) により照射されることで、サンプル内の一種以上の特定の目標注目の被検体の有無もしくは量の決定を促進する。生体検知用途においては、光導波路からのエバネッセント波 (eva

nescent wave)を利用すべく、多くの光学的技術が開発されている。

【0005】

たとえば高スループット検知に対する光導波路の使用は、質量(1998年、Silzel等)または蛍光(1995年、Stimpson等;1998年、Wadkins等;1999年、Flowman等)検知技術のいずれかを用いて達成され得る。これらの検知技術は両者ともに、イムノアッセイ(1998年、Silzel等;1998年、Wadkins等;1999年、Flowman等)および遺伝学的スクリーニング(1995年、Stimpson等)を行う導波路において有用であることが明らかにされた。

【0006】

光導波路が、いわゆる“質量センサ”として使用される場合、捕捉された被検体の存在は、先ず捕捉用分子をサンプルに露出する前に導波路の表面上または近傍で捕捉用分子の基線吸収または屈折率を測定し、次にサンプルに対して上記捕捉用分子を露出し、続いて捕捉用分子と該分子に結合もしくはハイブリッド形成(hybridize)した被検体の吸収または屈折率の差を決定することにより、検出または測定され得る。このメカニズムによれば、サンプル内の被検体に対し捕捉用分子がハイブリッド形成すると同時に測定信号が変化する。この信号変化は、導波路のエバネッセント場(evanescent field)内に存在する質量に比例する。

【0007】

導波路質量検知技術は、一般には、光学的生体検知において広範に使用される(1987年、Liedberg等)表面プラズモン共鳴(SPR)5に頼っている。表面プラズモン(surface plasmon)は、金属などの一方の媒体が負の誘電定数を有するという2つの媒体間の界面に存在し得る(1993年、Peyghambarian等)と共に、位相整合を獲得すべく光学的線引回折格子またはプリズムを用いて共鳴的に励起され得る。被検体の屈折率振動はこの共鳴を阻害するが、振動が大きいほど分子量は大きい。これらのセンサはイムノアッセイ(1987年、Cullen等;1992年、Morganおよ

びTaylor) および分子診断検定(1995年、Watts等; 1997年、Nilsson等; 1997年、Bianchi等) に対して使用されると共に、市販されている(検討のためには1992年、MalmqvistおよびKarlssonを参照)。親和力感度は大きな被検体分子量に対してはnM(ナノモル) 範囲であり(1992年、MorganおよびTaylor) 且つ小さな被検体分子量に対しては μ M(マイクロモル) 範囲であり(1995年、KarlssonおよびStahlberg)、また、共鳴ミラーを用いて20fM/mm² の単位面積当たりの感度が測定された(1995年、Watts等)。質量を増大すべく被検体により被覆されたナノ粒子も使用され、0.1pMの感度をもたらした(1997年、Kubitschko等)。他の導波路センサは、光散乱(1995年、Stimpson等)、干渉法(Interferometry)(1997年、Schneider等) および導波路吸収分光法(1999年、MendesおよびSaavedra) に基づいている。

【0008】

蛍光が用いられる場合には光導波路内にエバネッセント波を生成すべく電磁放射線が使用され得る。、該エバネッセント波はたとえば、導波路の表面上または同表面に隣接して固定化された捕捉用分子の結合部位に対して注目中の被検体と競合する分子に結合された、蛍光タグ(fluorophore) とも称される蛍光染料または同様のタグを励起する。上記蛍光タグは電磁放射線を発し、その強度はサンプル内の被検体の有無もしくは量を表す。

【0009】

蛍光検知技術を用いる光導波路センサについて、感度は、各被検体とその対応捕捉用分子との間の親和力強度、ならびに、蛍光タグの吸収係数および収率蛍光量子収率(fluorescence quantum yield) に依存する。蛍光検知技術は一般的に、質量検知技術よりも高感度でありかつより特異的である。

【0010】

光導波路における蛍光検知技術の試みの多くは光ファイバの使用に基づく(1996年、Abel等; 1998年、Squillante) が、平面導波路に

よっても研究は為されて来た（1991年、Zhou等；1993年、Herron等；1996年、Flowman等）。平面導波路センサは免疫アッセイ（1991年、Zhou等；1993年、Herron等）および分子診断検定（1996年、Flowman等）の研究において使用されて来たが、後者はfM（フェムトモル）感度が低いことが明らかにされた。

【0011】

ナノ粒子は、光散乱要素として（1991年、YguerabideおよびYguerabide）、または蛍光タグに対する代替物として使用されて来た。

光導波路が使用される場合、導波路は自身上またはそれに隣接して、異なる種類の捕捉用分子が固定化される個別の検知領域を備え得る。セグメント化導波路の個別の検知領域の全ては、親和力相互作用の全時間的動態を捕捉し得る荷電結合素子（“CCD”）配列を使用して並列に識別され得る。配列サイズは固定化された捕捉用分子のパターンニングにより制限され（1998年、Silzei等）、感度は単位感度領域当たりの捕捉被検体数と用いられた検知技術とにより制限される。但し、新たなパターンニング技術に依り、光導波路の検知領域の密度は増大し続けている（1995年、Morgan等；1998年、Stimpson等）。

【0012】

現在の技術状況において、セグメント化導波路の検知領域のサイズは常に縮小している。セグメント化導波路の検知領域のサイズの縮小に伴い、導波路により被検体が検出され得る感度が比例して減少している。故にセグメント化導波路のシステム要件は、ますます厳しくなりつつある。

【0013】

更に、セグメント化導波路の使用は、励起放射線が導波路の平面内に制限されないもので、幾分か不都合である。故に、1つの検知領域から発せられた電磁放射線は、隣接する1つ以上の検知領域から発せられた電磁放射線と干渉することによって、セグメント化導波路の光学的効率を低減し、故に、セグメント化導波路が使用されたときに各被検体が検出され得る信頼度が低下し得る。セグメント化導波路の各隣接検知領域間の干渉を容認可能なレベルまで低減するには、捕捉用

分子が固着されるかまたはサンプルが導入される各検知領域の面積が、検知領域の総面積の25%未満に制限され得る。結果として、セグメント化導波路は比較的に低感度である。

【0014】

光導波路に対する関連手法は、いわゆる“バイオチップ”であり、いわゆる“DNAチップ”(1999年、Vo-Dinh等;1999年、Hacia;1999年、Lipshutz等)がその一例である。自己組織化単分子膜(self-assembled monolayer)または同様のパターンニング技術を用いて作製され得るバイオチップは、検知領域の極めて大きな配列(たとえば、100,000個以上までの検知領域)を有し得る。而して、被検体を検出すべくセグメント化導波路が用いられた場合に使用されるのと殆ど同じ様式にて、サンプルがバイオチップに塗付され、サンプル内の一種類以上の注目中の被検体がバイオチップ上の捕捉用分子に結合して、各被検体の有無もしくは量、または、対応被検体に対する捕捉用基質のハイブリッド形成特性が検出される。

【0015】

たとえば、1つ以上の波長の電磁放射線をバイオチップの各検知領域へと指向させて検知領域内の蛍光染料を励起するためには、光ファイバ・プローブ、走査型近接場顕微鏡または共焦点顕微鏡が使用され得る。その場合、光ファイバ・プローブもしくは共焦点顕微鏡は、各検知領域内の蛍光標識から発せられる電磁放射線を検出すべく使用され得る。光ファイバ・プローブもしくは共焦点顕微鏡が使用される場合には、バイオチップはラスタ走査(raster scan)、すなわち一度に1つの検知領域を走査され得る。プローブ自体が横方向の光学的局限性を提供するため、バイオチップの各検知領域は接近して隣接され得、これは非常に高密度の検知領域を備えたバイオチップの可能性に繋がる。しかしながら、稠密な配列の検知領域を備えたバイオチップを走査するには時間が必要であるため、斯かる順次的検出は幾分か不都合である。更に、一般にバイオチップ上で生ずる各ハイブリッド形成反応は、それが終点に到達したときに分析されることから、数時間を要し得る。しかも、異なる反応は異なるハイブリッド形成温度を必要とし得る。結果として、多数の異なるハイブリッド形成反応を単一バイオ

チップ上で同時に行うのは困難となり、ラスタ走査されたバイオチップからの結果を求めるために必要な時間が更に増大し得る。

【0016】

各バイオチップ上の複数の検知領域を同時に分析すべく並列検出技術も使用され得るが、単一バイオチップ上で行われるべき、異なるのハイブリッド形成反応の異なる温度依存性により並列検出技術も複雑となり得る（1998年、Fotin等）。此処でも、多数の温度にて反応を行って、測定値を求める必要があり得る。

【0017】

これらの温度依存性問題に応じて検定技術が開発された。この技術において、バイオチップの異なる検知領域で生ずる異なるハイブリッド形成反応の各ハイブリッド形成速度は1つ以上の別個の温度もしくは狭い温度範囲にて同時に測定される（1997年、Jensen等）。

【0018】

提案された別の検定技術は、ミクロスフェア（microsphere）の表面上で個々の化学的反応を行う工程を有する（1998年、Michael等）。各ミクロスフェアは、撮像用ファイバ束の末端にエッチングされた個々の凹みに堆積される。凹みのキャビティ効果は非干渉照射によりマスクされるが、ミクロスフェアの表面上の反応を検知するCCDが上記撮像用ファイバ束と並列に使用され得る。

【0019】

低閾値レーザ（1992年、McCall等；1995年、Zhang等；1997年、Baba）および光スペクトル・フィルタ（1997年、Rafizadeh等；1997年、Blom等；1998年、MadsenおよびJhao；および、1998年、Little等）においては、平坦すなわち平面的な円筒状のマイクロキャビティが使用されてきた。これらの円筒状マイクロキャビティは、半導体材料（たとえばケイ素）およびガラスなどの種々の材料から作製されてきた。研究によれば、 $10.5\mu\text{m}$ のキャビティ直径を有する平面的円筒状マイクロキャビティは 35nm の自由スペクトル領域（FSR）と8,000

より大きなキャビティQ値とを有し得ることが示された。また、斯かる平面的円筒状マイクロキャビティにより実施された有限差分時間領域(FDTD)の研究(1996年、LiおよびLiu:1997年、Hagness等)は、最適化された設計態様によれば100nmを超えるFSRおよび 10^4 以上のキャビティQ値が可能であることを示唆した。これらの結論は、キャビティ表面粗度の理論的研究(1996年、LittleおよびChu)により裏付けられた。しかし円筒状マイクロキャビティは典型的には、照射電磁放射線がこれらの円筒状マイクロキャビティの体積の全体に互り進行する様に、円筒状マイクロキャビティの平面端部から照射されていた。

【0020】

しかしながら、本発明者が知る限り、増進された感度を提供すべくウィスバリング・ギャラリモードの使用を促進する共鳴式光キャビティを備えると共に、少なくとも約 10^4 のクオリティ・ファクタ(quality factor)を有するバイオセンサは使用されていない。

【0021】

発明の開示

当業界においては形態依存性共鳴(morphology-dependent resonances(MDR))および疑似正規モード(quasi-normal mode(QNM))としても知られるウィスバリング・ギャラリモード(WGM)は、光が光キャビティ内を循環し、全内反射に対する臨界角を常に超える入射角にて光キャビティの湾曲境界から反射した場合に生ずる。別様に述べると、ウィスバリング・ギャラリモードは電磁放射線(たとえば光)が光キャビティ内で反射する(bounce)ときに生ずる。光キャビティ内における電磁放射線の斯かる移動が実質的に単一平面内に制限される場合には、2次元ウィスバリング・ギャラリモードが生ずると表現される。また、電磁放射線が単一平面に制限されない様に、光キャビティ内で電磁放射線が反射される場合には、3次元ウィスバリング・ギャラリモードが生ずると表現される。

【0022】

本発明は、ウィスバリング・ギャラリモードを生成して活用する共鳴式光キャ

ビティを含むバイオセンサ、および、斯かるバイオセンサを用いる方法を包含する。本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティを備えるバイオセンサは、迅速な高スループット診断検定、並びに且つ従来の光学バイオセンサが用いられてきたあらゆる用途にのために構成される。

【0023】

本発明の教示を取り入れたバイオセンサの具体的な実施形態において、共鳴式光キャビティは、ほぼ平面である基板上に作製された平坦または平面的な微細加工構造である。本明細書中においてバイオセンサの円筒は、円筒状光キャビティまたは単に円筒状キャビティと称される。好適には、基板に相対して配置された円筒状キャビティの露出表面は、ほぼ平面であり、且つほぼ表面欠陥を有さない。上記円筒状キャビティの周縁部は帯片状導波路などの少なくとも1つの電磁放射線伝播ポート (transmission port) に対して接線方向にて当接し、該導波路はレーザなどの電磁放射線源と連通する。

【0024】

上記円筒状キャビティの露出表面の少なくとも一部上には、一種類以上の特定の被検体に対して既知の特異性を有する捕捉用基質が固定化される。上記捕捉用基質が特異的である単一または複数の被検体を含むサンプルが上記円筒状キャビティの露出表面上に導入されると、サンプル中の単一または複数の被検体の少なくとも幾つかは上記捕捉用基質に結合するか、または同捕捉用基質とハイブリッド形成する。電磁放射線源の照射時、電磁放射線は上記伝播ポートから円筒状キャビティ内へと進行し、円筒状キャビティの露出表面上の捕捉用基質に対するサンプル内の被検体の結合の検知を促進する。

【0025】

本発明に係る共鳴式光キャビティの別の具体的な実施形態としては、端部に円筒状共鳴式光キャビティを備えた光ファイバなどのバルク (bulk) 円筒状基板が挙げられる。上記の微細加工実施形態と同様にバルク円筒状キャビティは帯片状導波路などの少なくとも1つの電磁放射線伝播ポートにより接線方向に当接され、該伝播ポートはレーザなどの電磁放射線源と連通している。円筒状キャビティの露出表面上に配設された捕捉用基質は、被検体がサンプル内に存在するな

らば該被検体と結合する。斯かる結合は、上記電磁放射線源および伝播ポートを介して上記円筒状キャビティ内に電磁放射線を導入することによって検出され得る。

【0026】

本発明の教示を取り入れた円筒状光キャビティの上記形状によれば、ウィスバリング・ギャラリモードの生成が促進される。本発明においては、電磁励起放射線が好適には円筒状キャビティの周縁部を介して該キャビティ内に導入され、上記円筒状キャビティのほぼ平坦な表面における該キャビティ内での2次元ウィスバリング・ギャラリモードの生成を促進する。ウィスバリング・ギャラリモードは、円筒状キャビティの露出表面上での、電磁励起放射線に対する分子および分子ハイブリッド露出を引き延ばす。

【0027】

本発明のバイオセンサの円筒状キャビティはまた、非常に大きな（たとえば約 10^4 以上）のクオリティ・ファクタ（Q）も有する。大きなクオリティ・ファクタを有する光キャビティは一般に、該光キャビティの本質的な材料吸収が低いこと、キャビティのコアの屈折率と光キャビティの平面内およびその周囲の材料の屈折率との間のコントラストが大きいこと、および、回折損失を減少するキャビティ直径が比較的に大きいことを示す。また、光キャビティの露出表面の粗さにより引き起こされた散乱が比較的に低く、且つ光キャビティと隣接する伝播ポート（たとえば帯片状導波路）との間の連結強度が比較的に大きいときにも、光キャビティのクオリティ・ファクタは大きくなる。更に、光キャビティのクオリティ・ファクタは、該キャビティの特定ウィスバリング・ギャラリモードに依存する。

【0028】

これに加え、本発明の教示を取り入れたバイオセンサにおいて有用である円筒状キャビティは、現在の技術水準の導波路の感度より少なくとも約1桁は大きな感度を有する。

【0029】

現在の技術水準の導波路と比較して非常に大きなクオリティ・ファクタおよび

大きな感度を提供すべく、十分なWGMを生成する他の構成の共鳴式光キャビティを含むバイオセンサもまた、本発明の範囲内である。

【0030】

本発明の教示を取り入れたバイオセンサは、臨床的診断、環境および食品の検査、ゲノム研究および遺伝学的スクリーニングなどの種々の用途、並びに、導波路、バイオチップおよび他の検定ツールが用いられ得る他の用途において有用であるが、これらに限定されるものではない。

【0031】

本発明はまた、本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティを作製する方法、並びに、斯かる共鳴式光キャビティを含むバイオセンサを用いる方法も包含する。

当業者であれば、以下の説明、添付図面および添付の請求の範囲を考察することによって本発明の他の特徴および利点は明らかであろう。

【0032】

発明を実施する最良形態

共鳴式光キャビティの設計態様

本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティは、従来の導波路のクオリティ・ファクタを超えるクオリティ・ファクタ（Q）を有する2次元ウィスパリング・ギャラリモード（WGM）を利用すべく設計される。光キャビティのQは一般には、該光キャビティの材料による電磁放射線の基礎吸収の減少、光キャビティの屈折率と光キャビティの平面内に存在する材料の屈折率との間のコントラストの増大（これは強い導波に繋がる）、および、光キャビティの直径の増大（これは回折損失を減少する）に伴って増大する。光キャビティのQはまた、キャビティ境界のエッチングに依る表面粗さの散乱の減少および隣接する帯片状導波路との連結強度（coupling strength）の減少に依っても増大し、且つ、光キャビティの特定ウィスパリング・ギャラリモードに強く依存する。

【0033】

本発明の共鳴式光キャビティは、少なくとも約 10^4 、さらに約 10^9 程度以上の大きさのクオリティ・ファクタを有すべく設計される。斯かる大きなクオリ

ティ・ファクタは一般的に、光子（すなわち電磁放射線）が光キャビティ内に残存する時間長を増大し、その結果、光キャビティ内の電磁放射線の強度が増大し、且つ電磁放射線が上記キャビティから自発的に放出される割合が大きくなる。

【0034】

これに加え、蛍光技術を用いるバイオセンサで使用される場合に本発明に係る共鳴式光キャビティは、蛍光タグを励起するか、または蛍光タグにより吸収される電磁励起放射線の波長と、蛍光タグから発せられた電磁放射線の蛍光もしくは放出の波長との両者のピークにて高いQの共鳴が生ずるように設計され得る。これらの2つのピークにおける共鳴は、“二重共鳴”と称される。故に共鳴式光キャビティからの電磁放射線の自然放出の割合が増加すると、蛍光の収率が向上増進される一方、蛍光タグから発せられた蛍光は円筒状キャビティにより再吸収されて蛍光タグを更に励起し、それによりタグから発せられた蛍光の強度を増大する。少なくとも蛍光検知技術が用いられた場合、“二重共鳴”の光キャビティは単一共鳴式光キャビティよりも約10倍（すなわち1桁の大きさ）以上高感度であると確信される。

【0035】

光キャビティの自由スペクトル領域（FSR）は、隣接する各縦モード間の周波数分離である。キャビティの自由スペクトル領域が蛍光タグから発せられた電磁放射線の線幅を超えると、蛍光収率の増進が生ずる。光キャビティの自由スペクトル領域は、キャビティのサイズおよび屈折率により決定される。蛍光収率は、特定の自由スペクトル領域およびQを有するように光キャビティを構成すると共に、理想的に狭幅で、かつ光キャビティ内で電磁励起放射線の共鳴線幅に整合する望ましい蛍光線幅を備えた蛍光タグを選択することによって最適化され得る。蛍光タグを囲繞する溶媒（たとえばサンプルの水溶液）は蛍光線幅の不均一な広がりを引き起こす可能性はあるが、この影響は、発せられた電磁放射線の動的なスペクトル狭幅化およびスペクトル拡散を介して溶媒和動態により相殺され得る。これは、蛍光収率を増進し得る、かつ発せられた蛍光放射線の線幅を励起放射線の線幅に対して更に忠実に整合させ得る。

【0036】

円筒状もしくはディスク状のキャビティに対し、特定の半径方向モード (radial mode)、すなわち円筒状キャビティを通過する動作のパターンによる電磁放射線の経路のQは、円筒状キャビティの周囲縁部に対する該半径方向モードの近さ、すなわち半径方向モード数に依存する。低い数すなわち低い次数の半径方向モードは主として、円筒状キャビティの周囲縁部の近傍に局限されて大きなQを有する。高次の半径方向モードの経路は円筒状キャビティ内において更に中心へと延在すると共に、これらの半径方向モードは低いQを有するが、円筒状キャビティの表面上に更に大きな検知面積を提供する。円筒状キャビティを通る電磁放射線の半径方向モードは種々の要因により影響されるが、斯かる要因としては、円筒状キャビティの特性、円筒状キャビティに連結された伝播ポートの幅および有効屈折率などの特性、伝播ポートと円筒状キャビティとの間の間隙もしくは間隔の大きさ、および、上記伝播ポートを介して円筒状キャビティと連通する電磁放射線源のスペクトル帯域幅が挙げられるが、これらに限定されるものではない。故に、円筒状キャビティを通る電磁放射線の種々の半径方向モードは、円筒状キャビティに対して電磁放射線伝播ポートを関連させる特性および様式、円筒状キャビティの特性、および、電磁放射線源の特性を制御することにより制御され得る。

【0037】

本発明の教示を取り入れた円筒状共鳴式光キャビティを設計する上で、円筒状キャビティの感度は、高いQを持つモードと、円筒状キャビティの平面的表面に沿って大きな表面積をカバーするモードとの間の最適配分もしくはバランスを決定することで最大化され得る。斯かる最適配分はたとえば、解析結果および有限差分時間領域 (FDTD) のシミュレーションにより決定され得る。

【0038】

円筒状キャビティ、伝播ポートおよび電磁放射線源の特性の考察に加え、円筒状キャビティの平面的表面に対して固定化された捕捉用基質、および、捕捉用基質を固定化するのに必要な任意の接着促進剤もまた、円筒状キャビティの初期Q (すなわち捕捉用基質による被検体の結合前のQ) に影響を及ぼし得る。円筒状キャビティのQに関する捕捉用基質および接着促進剤の影響は、円筒状キャビテ

ィの屈折率よりも低い屈折率を有する捕捉用基質および接着促進剤に起因し得る（たとえば、ビオチン-T3オリゴヌクレオチドに連結されたニュートラアビジン（neutravidin）の捕捉用基質単層は約1.33の固定屈折率を有する一方、酸化ケイ素製の光キャビティは約1.5乃至約2.2の屈折率を有する）。放射線の損失はQを低下せしめ、光キャビティによる共鳴の位置を変更し得る。逆に、光キャビティからの放射線が損失されると、光キャビティによる半径方向モードの各々の大部分が検知プロセスに関連させられて、光キャビティの感度を実効的に増大する。故に本発明の円筒状キャビティは、実験的フィードバックによる数値的シミュレーションなどの公知プロセスにより評価され得るこれらの放射線損失の影響を考慮するように設計され得る。放射線の損失は次に、光キャビティの厚みと、光キャビティおよび下側に位置する対照層の夫々の屈折率を調節することで適切に制御され得る。

共鳴式光キャビティを設計する際にこれらの要因の全てを考慮した場合、約 10^4 以上のQ値が得られ得る。

【0039】

代表的なバイオセンサの実施形態

図1を参照すると、本発明の教示を取り入れたバイオセンサ10の具体的な実施形態が示される。示されているようにバイオセンサ10は、共鳴式光学的検定構造体12、該共鳴式光学的検定構造体12と連通する少なくとも1つの伝播ポート14、および、伝播ポート14と連通する電磁放射線18の供給源16を備えている。

【0040】

共鳴式光学的検定構造体12は、ガラス、石英、ケイ素または他の半導体材料（たとえば砒化ガリウムもしくはリン化インジウム）から成る基板22と、該基板22上の対照層24と、対照層24上に配置されて本明細書中では円筒状キャビティ26とも称される平坦な円筒状共鳴式光キャビティとを備え得る。対照層24は好適には、円筒状キャビティ26を形成する材料の屈折率と対照を為す屈折率を有する材料から形成される。円筒状キャビティ26は、材料層25により側方に圍繞され得る。円筒状キャビティ26が照射されるべき電磁放射線の波長

に対し、円筒状キャビティ26および対照層24の各屈折率間のコントラストは約1:1より大きく（すなわち上記円筒状キャビティは対照層24の屈折率を超える屈折率を有し）且つ、少なくとも約1.5:1であるのが好適である。

【0041】

本発明の範囲を制限するのでは無く例示的にのみ、対照層24に二酸化ケイ素（ SiO_2 ）が使用される場合、シリカ（すなわち、ホウケイ酸ガラス、燐ケイ酸ガラス（phosphosilicate glass）またはホウ素燐ケイ酸ガラスなどのドーパされた SiO_2 ）、酸窒化ケイ素（ SiO_xN_y 、もしくは SiON ）、または、対照層24の材料よりも大きな屈折率を有する別の適切な材料を使用して円筒状キャビティ26を形成し得る。殆どの一般的な半導体適合媒体とは異なり、 SiON は望ましい屈折率を有することに加え、電磁放射線の可視スペクトルにおいて非常に低い損失（材料損失および散乱損失を含めて0.2dB/cm以下）を有する。これにより、円筒状キャビティ26が SiON から形成される場合に利用され得る光学的波長の選択には大きな融通性が与えられる。

【0042】

円筒状キャビティ26の直径は好適には、所望のクオリティ・ファクタを有する円筒状キャビティを与える。斯かる円筒状キャビティ26の直径によれば、大寸で稠密なセンサ配列の作製が促進される。本発明の教示を取り入れた代表的な円筒状キャビティ26は約 $10\mu\text{m}$ ～約 $50\mu\text{m}$ の直径を有することから、1平方センチメートル（ cm^2 ）当たり約 500×500 個までの円筒状キャビティ26の密度を有するセンサ配列の作製が促進される。

【0043】

各円筒状キャビティの露出主要表面28は好適には、ほぼ平面であると共に実質的に表面欠陥が無い。各円筒状キャビティ26の表面28上またはその近傍には、1つ以上の注目中の被検体に対して特異的な抗体、抗原、他のポリペプチド類、ヌクレオチド類（RNAまたはDNA）および細胞を含むが、これらに限定されない捕捉用基質34が固定化され得る。

【0044】

次に図1A乃至図1Fを参照すると、共鳴式光学的検定構造体12を作製する上では微細加工技術とも称される従来の半導体デバイス作製技術が用いられ得る。単なる例として、基板22は（たとえばケイ素、砒化ガリウムまたはリン化インジウムなどの）半導体材料製のウェハの全体もしくは一部として、または、（ガラス上ケイ素（SOG）、サファイア上ケイ素（SOS）、またはセラミクス上ケイ素（SOC）などの）絶縁体上シリコン（SOI）型の基板として提供され得る。

【0045】

図1Aに示された如く、所望材料製の対照層24は公知のプロセスにより基板22上に形成され得る。たとえば対照層24としてSiO₂が用いられる本発明の実施形態において、基板22の活性表面23上には、（たとえば熱的に、活性表面23を酸化剤に露出するなどの）公知の酸化プロセスを用いて所望深度のSiO₂が形成され得る。これに代わって、対照層24のSiO₂は、化学気相成長（CVD）などの公知プロセスにより活性表面23上に堆積されてもよい。

【0046】

図1Bを参照すると、引き続き円筒状キャビティ26を形成するための材料層25が公知プロセスにより対照層24上に配設され得る。一例として、対照層24上には、公知のCVDもしくはスピノンガラス（SOG）技術などの公知プロセスにより、シリカもしくはガラス製の層25が形成され得る。これに代わって、たとえば公知のCVDプロセスによりSiON製の層25が作製されてもよい。

【0047】

層25はまた、公知プロセスによりパターンニングされてもよい。一例として図1Cに示されたように、パターンニングされるべき下側層25の領域をカバーし、ポジまたはネガのフォトマスクとして公知であるフォトマスク29が、公知のフォトリソグラフィ・プロセスによりフォトレジストを配設することにより形成され得る。該公知プロセスとしては、高解像度（たとえば約0.5 μm以下の）レティクルもしくはフォトマスクまたは電子ビーム・リソグラフィの使用が挙げられ、これらを使用して高解像度（すなわち最小化された放射線散乱）で小寸

の（たとえば約 $10\mu\text{m}$ 乃至約 $50\mu\text{m}$ の直径の）円筒状キャビティ26の形成を促進し得る。

【0048】

図1Dに示された如く、フォトマスク29を貫通する開孔30は、層25をエッチングするために使用されるプロセスに耐える金属もしくは SiO_2 などの他のマスク材料31により充填され得る。マスク材料30は、湿潤浸漬プロセスまたは機械的もしくは化学機械的研磨プロセスなどの公知技術によりフォトマスク29の上側の箇所から除去され、図1Eに示されたような硬質マスク32を形成する。次に、これもまたレジスト剥離剤を使用するなどの公知プロセスによりフォトマスク29は層25から除去される。

【0049】

図1Fを参照すると、円筒状キャビティ26の周囲縁部27は基板22の平面に対してほぼ直交するのが好適であることから、硬質マスク32を介して層25の材料を除去すべく反応性イオンエッチング（RIE）などの公知の異方性エッチング技術が使用され、層25の材料から円筒状キャビティ26を形成する。

【0050】

次に硬質マスク32の材料が、円筒状キャビティ26が形成される材料に関して選択的であるエッチングプロセスを使用するなどの公知プロセスにより円筒状キャビティ26の上方から除去され得る。

【0051】

伝播ポート14は、対応する円筒状キャビティ26と同一の様式にて円筒状キャビティ26の作製と同時にもしくは別に、基板22上に作製され得る。

これに代わって、公知の帯片状導波路もしくは光ファイバなどの様な別個に作製された伝播ポート14が、基板22上に形成された少なくとも一個の円筒状キャビティ26の周囲縁部27に当接するように、共鳴式光学的検定構造体12と組み合わせられ得る。いずれの場合にも伝播ポート14は、当業界で公知の如く供給源16に連結されるか、または連通し得る。

【0052】

図2Aおよび図2Bには、伝播ポート14が微細加工円筒状キャビティ26の

配列11に対して励起電磁放射線を供給し得る様式の例が示される。たとえば伝播ポート14は、配列11の各円筒状キャビティ26に供給を行う光分配ネットワークを備え得る。図2Aに示された如く伝播ポート14は、各円筒状キャビティ26に対して直列的に供給を行う単一の光バスであって各円筒状キャビティ26の1の各列の端部にて180°の転回を行う光バスを備える。

【0053】

これに代わって、図2Bに示したように、伝播ポート14'は配列11の各列もしくは各行の円筒状キャビティ26に電磁励起放射線を供給する別体の導液路14a, 14b, 14cなどを備え得る。伝播ポート14'は、“ツリーバス・ネットワーク”とも称される。

【0054】

各円筒状キャビティ26からは有限量の励起放射線が損失されることから、伝播ポート14, 14'内に存続する電磁励起放射線の強度は、各円筒状キャビティ26に対して放射線が供給された後に順次(in series)低下する。故に伝播ポート14, 14'と各円筒状キャビティ26との間のキャビティ連結割合(coupling fraction)は、好適には、伝播ポート14, 14'による各円筒状キャビティ26に対する該伝播ポート14, 14'の長さ にわたるほぼ均一な強度の電磁励起放射線の供給を促進するように順次増大する。

【0055】

図1に戻ると、各円筒状キャビティ26の表面28に対しては接着促進剤33が塗付され、表面28に対する一個以上の捕捉用基質34の固定化が促進される。本発明の範囲を制限するのではなく例示的に、表面28に対してはニュートラアビジンが吸着され、該表面28に隣接するビオチン化核酸(たとえばオリゴヌクレオチドを含む、RNAまたはDNAなど)の固定化を促進する。

【0056】

また、蛋白質(たとえば抗体および抗原)、ペプチド、核酸(たとえばDNAおよびRNA)、他の生体分子、ならびに、バクテリアおよびウイルスなどの微生物を含むがこれらに限定されない捕捉用基質34は、公知プロセスにより各円

筒状キャビティ26の表面28上または同表面に隣接して配置されて固定化され得る。たとえば適切な濃度の捕捉用基質34を含む溶液が表面28上または表面28上の接着促進剤33上に載置され得る。このプロセスは当業界において典型的には“パドル・コーティング (puddle coating)”と称される。表面28、該表面上の任意の接着促進剤33および捕捉用基質34は次に、適切な時間に互い適切な温度（すなわち、捕捉用基質34を劣化させることなく、または、注目中の被検体に対する捕捉用基質34の結合またはハイブリッド形成の機能に悪影響を与えることなく表面28または該表面28上の接着促進剤33に対する捕捉用基質34の吸着を促進する温度および存続時間）に露出されることで、表面28に対して捕捉用基質34を固定化し得る。

【0057】

表面28に対して生体分子を固定化するように開示されたアヴィジン-ビオチン化学物質の代替策として、ヌクレオチド（すなわちDNAおよびRNA）および他の生体分子などの捕捉用基質34を表面28に固定化する上では公知のエポキシシラン化学物質が有用であり得る。

【0058】

表面28に対して捕捉用基質34を固着するために使用され得る方法の一例として、表面28に対しては金の原子層が塗付され、この金に対してはビオチン化チオール (biotinylated thiol) が吸着され、円筒状キャビティ26の外側の周囲に、またはある配列の隣接する円筒状キャビティ26同士の間疎水性シランを塗付しても良い。しかし、親水性であるビオチン化チオールは表面28に対する捕捉用基質34の固定化を促進する一方、疎水性シランは表面28の側方に隣接する形状構成に対する捕捉用分子の吸着を防止すると共に、円筒状キャビティ26の近傍に固着された捕捉用分子などの異なる種類の捕捉用基質34の側方相互汚染も防止する。

【0059】

他の異種固定化技術（すなわち光キャビティの稠密配列に対し、異なる種類の捕捉用基質34の塗付を促進する技術）としては、自己集合プロセス、光パターンニング (photopatterning) および組み合わせ合成 (comb

inatorial synthesis) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0060】

次に図3を参照すると、本発明の教示を取り入れたバイオセンサ10'の別の具体的な実施形態が示される。バイオセンサ10'は、バルク円筒状基板22'の端部上に形成されたバルク円筒状キャビティ26'の形態の共鳴式光キャビティ12'を備える。少なくとも1つの伝播ポート14は、光キャビティ12'と連通するようにバルク円筒状キャビティ26'の周囲縁部27'に当接して、または該周囲縁部27'の近傍に配設される。伝播ポート14はまた、電磁放射線18の供給源16とも連通する。

【0061】

バルク円筒状キャビティ26'の作製の一例として図3Aは、適切な材料から形成されたロッド25'が、最終的にはバルク円筒状キャビティ26'となる数個の薄寸ディスク状セグメント25a'、25b'、25c'へと区分され得ることを示している。ロッド25'は、中実ファイバまたは中空の毛細管ファイバのいずれであってもよい。ロッド25'は好適にはガラスから形成されるが、他の任意の適切な導波路材料が使用され得る。ロッド25'は任意の直径を有し得るが、ロッド25'は約1mm乃至約5mm、更に好適には約5mmの直径を有する。各セグメント25a'、25b'、25c'などは好適には約2mmの高さを有するが、異なるセグメント25a'、25b'、25c'の高さもまた本発明の範囲内である。

【0062】

ディスク状セグメント25a'、25b'、25c'の各々の平坦表面28'もしくは端部は、公知技術により研磨される。研磨されたこの表面28は次に、公知のイオン交換による導波路作製技術を用いてカリウムイオン(K⁺)、ナトリウムイオン(Na⁺)またはその組合せなどの適切な材料により拡散またはドーピングされて、表面28'でバルク円筒状キャビティ26'を形成する。表面28'は好適には斯かる材料により、数ミクロンの深度まで拡散される。

【0063】

図3Bに示されたように、図1に関し本明細書中で先に論じられた円筒状キャビティ26の微細加工実施形態に関して開示されたのと同じの様式にて、捕捉用基質34は表面28'に対して固定化され得る。表面28'は円筒状キャビティ26の表面28よりも相当に大きな面積を有し得ることから、表面28'の異なる反応領域28a'、28b'、28c'などに対しては異なる種類の捕捉用基質34（すなわち異なる分析用化学物質）が固定化され得る。

【0064】

バイオセンサ10およびバイオセンサ10'は両者ともに、その円筒状キャビティ26、26'の各々に関連するセンサ40を備え得る。図3に示されたようにセンサ40は、（たとえばカリフォルニア州、サンタクララのIntel社により製造されたPENTIUMクラスのマイクロプロセッサなどの）プロセッサ50と作用的に結合されたCCD配列を含む。バイオセンサ10（図1）においては、配列の各円筒状キャビティ26は、センサ40のCCD配列の内の少なくとも1つの対応ピクセル42と整列される。配列における約 10^5 個以上もの多くの円筒状キャビティ26を選別するために、従来のCCD配列が使用され得る。バイオセンサ10'（図3）において、表面28の各反応領域28a'、28b'、28c'などは少なくとも1つの対応ピクセル42と整列される。バイオセンサ10の特定の円筒状キャビティ26の表面28から、または、バイオセンサ10'の表面28'上の特定の反応領域28a'、28b'、28c'などから電磁放射線が発せられたとき、プロセッサ50はセンサ40の一個以上の対応ピクセル42からのデータを収集し、対応する表面28または反応領域28a'、28b'、28c'などに対して固定化された捕捉用基質34の種類に関して記憶された情報に基づき、サンプル内における一種類以上の被検体の存在、サンプル内の被検体の量、または、捕捉用基質34とサンプル内の対応被検体との間のハイブリッド形成動態（hybridization kinetics）に関するデータを生成して出力する。円筒状キャビティ26、26'から発せられる電磁放射線を検出するためにバイオセンサ10、10'と共に他の公知の種類のセンサが用いられ得るのは勿論である。

【0065】

図4を参照すると、本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティ26”の別実施形態を含むバイオセンサ10”が示される。共鳴式光キャビティ26”は球状であると共に、(たとえば SiO_2 、 SiON などによりドーブされた)適切な基材を備え、その表面28”は公知のイオン交換による導波路作製技術を用いてカリウムイオン(K^+)、ナトリウムイオン(Na^+)またはその組合せなどの適切な材料により拡散またはドーブされる。共鳴式光キャビティ26”は実質的に完全にドーブされ得るか、または、表面28”に近接するキャビティ26”の部分のみがドーブされ得る。本明細書中において先に記述されたように、表面28”には捕捉用基質34が塗付され得る。

【0066】

共鳴式光キャビティ26”は、所望形状の担体内に保持され得ると共に、少なくとも1つの伝播ポート14、供給源16およびセンサ40と結合され得る(たとえば図3を参照)。

【0067】

本明細書中に開示された共鳴式光キャビティの実施形態のいずれもが、表面28, 28', 28”から捕捉用基質34を剥離してから同一または異なる種類の捕捉用基質を表面28, 28', 28”に塗付することで、再使用され得る。

【0068】

(検知方法)

質量検知

本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティの高いQに依れば、これらの光キャビティの共鳴は、固定化された捕捉用基質に対する被検体のハイブリッド形成により引き起こされる小さな屈折もしくは吸収の振動に対して敏感である。これらの振動に対する光キャビティの感度の故に、本発明の教示を取り入れたバイオセンサは、表面プラズモン共鳴(SPR)技術などの質量検知技術を用いて、サンプル内に一種類以上の被検体が存在するかを決定し、サンプル内の一種類以上の被検体を定量し、または、捕捉用基質と対応被検体との間のハイブリッド形成動態を評価し得る。

【0069】

本発明に係る共鳴式光キャビティの表面上の捕捉用基質および任意の接着促進剤の平均屈折率は、被検体が上記捕捉用基質に結合するか、または該捕捉用基質とハイブリッド形成するにつれて増大される。この様に光キャビティの屈折率が増大すると上記光キャビティの共鳴にシフトが生じ、被検体の存在を検出するために使用される電磁放射線の波長にて上記光キャビティのQを低下させる。この効果は“Q低下 (Q-spoiling)”と称される。光キャビティの共鳴の斯かるシフトを検出するために、捕捉用基質および該捕捉用基質とハイブリッド形成した任意の被検体により減衰される電磁放射線のスペクトルまたは強度測定などの公知プロセスが使用され得る。斯かる測定が行われ得る感度は、光キャビティのQに正比例する。捕捉用基質の結合部位に対して被検体または被検体と競合する分子を標識することが望ましくないという用途においては、質量検知が特に有用である。

【0070】

捕捉用基質に結合した被検体の存在を検出する代替的で更に実用的な方法は、図5に仮想線で示されるように（たとえば円筒状キャビティ26などの）光キャビティの表面に隣接して（たとえば帯片状導波路などの）反射ポート14”を配置せしめることである。この反射ポート14”は、円筒状キャビティ26からの光と結合する。円筒状キャビティ26の共鳴がシフトするにつれ、反射ポート14”を介して円筒状キャビティ26から出射する電磁放射線の強度は減少する。伝播ポート14により円筒状キャビティ26内に導入された電磁放射線の強度に対する、反射ポート14”を介して円筒状キャビティ26から出射する電磁放射線の強度の比率の変化は、捕捉用基質34により結合された被検体の親和力密度 (affinity concentration) と関連付けられ得る。

【0071】

質量検知技術は被検体を検出もしくは定量するために、1つの電磁放射線の波長のみを必要とすることから、質量検知技術が用いられる場合、本発明のバイオセンサはその1つの波長の電磁放射線にて共鳴する共鳴式光キャビティを備えるだけでよい。

【0072】

蛍光検知

サンプルにおける被検体の存在、サンプルにおける被検体の量、または、捕捉用基質とサンプル内の対応被検体との間のハイブリッド形成動態を決定するためには、本発明のバイオセンサと共に蛍光検知技術も使用され得る。蛍光検知技術が使用される場合、被検体分子は、または、捕捉用基質上の結合部位に対して被検体と競合する分子は蛍光タグにより標識される。該蛍光タグは好適には、該蛍光タグを励起する波長とは異なる波長の電磁放射線を発する。故に上記電磁励起放射線の波長は、蛍光タグの吸収可能波長の吸収帯域または範囲内に存在すべきである。たとえば蛍光タグを励起する電磁放射線の最適波長は、スペクトルの青-緑から緑の部分にわたる部分の何処かに存在し得る。

【0073】

本発明の教示を取り入れたバイオセンサにおいて使用される場合、これらのバイオセンサの共鳴式光キャビティは電磁励起放射線の光子の寿命を引き延ばす。この様に長い光子の寿命は、上記キャビティの表面にわたる実際距離よりも相当に長い、フェムトモル (fM) (10^{-15} M) の感度が達成された従来のスラブ導波路センサの表面積よりも相当に小さな表面積内である有効検知長さをもたらす。これに加え、本発明の共鳴式光キャビティ内における励起放射線の高強度は蛍光タグを誘起して励起放射線の複数の光子を吸収させ得る。これは、実質的にバックグラウンドから解放された被検体の高感度の検出という更なる利点を提供し得る。

【0074】

蛍光検知技術が用いられるときには、被検体を検出もしくは定量するために、少なくとも2つの波長の電磁放射線（1つは励起、1つは放出）が使用されるので、蛍光検知技術は、励起放射線および選択された蛍光タグから放出された放射線の両者の波長ピークにて共鳴する本発明に係る共鳴式光キャビティと共に使用されるのが好ましい。

【0075】

二光子吸収検知

共鳴式光キャビティ内の多量の励起放射線の蓄積は、励起放射線の高キャビテ

ィ内強度をもたらし、これにより蛍光タグが誘起されて二光子が吸収されたときに発光を行い得る。蛍光すなわち発出される放射線の波長は、吸収される励起放射線の波長よりも相当に短く、その結果、表面散乱、レイリー散乱、非弾性散乱、または任意の一光子蛍光の供給源などの様な励起供給源からの任意の一光子散乱は、高域通過光学フィルタにより完全に除去され得る。無洗浄検定 (wash less assay) に対し、非結合のオリゴヌクレオチドからの二光子蛍光は、干渉に関して無視し得る発生源である。最大感度に対する最大の二光子断面積 (two-photon cross-section) を得るために種々の蛍光タグが検討されている。二光子吸収を介して蛍光を効率的に誘起するために、電磁放射線源の波長は、蛍光による一光子吸収に対する波長ピークよりも長いのが、一光子吸収に対する波長ピークの2倍よりは短くすべきである。この条件は、上記電磁放射線源および蛍光タグに対して幾つかの制約を課すものである。約200mWまでのシングルモード・パワーを備えた980nmのレーザ・ダイオードが市販されていることから、蛍光タグの候補としては特に、490nmの吸収ピークを有するフルオレセイン、および、530nmの吸収ピークを有するR6Gが挙げられる。これらの蛍光タグの二光子断面積は、上記共鳴式光キャビティのエバネッセント波との相互作用を最大化するために考察される。

【0076】

二光子吸収検知が用いられた場合に、蛍光タグを励起するために使用される励起放射線の波長と、蛍光タグを励起するために蛍光検知技術で使用される励起放射線の波長との間の差の故に、二光子検知技術に対する共鳴式光キャビティは、励起放射線の適切な波長にて共鳴が獲得されるように設計される。二光子蛍光は、エバネッセント場に関する蛍光タグの位置の変化により変動する励起放射線の強度の二乗に比例する。

【0077】

二光子吸収は、一光子技術よりも大きな表面選択性および雑音耐性（すなわち、信号／バックグラウンド比）を提供する。二光子技術の感度および特異性は、考察された3種のマイクロキャビティ機構の中で最高であると確信される。

【0078】

共鳴式光キャビティを含むバイオセンサの用途

本発明の教示を取り入れたバイオセンサおよびその共鳴式光キャビティは、生体分子の親和力相互作用を用いる任意の用途において使用され得る。故に本発明のバイオセンサは、臨床的診断、環境検査、食品検査、遺伝学的スクリーニング、および核酸もしくは蛋白質の配列決定などの種々の実用的用途において有用であるが、これらに限定されるものではない。本発明に係るバイオセンサはたとえば、イムノアッセイ（IA）として、または、分子診断検定（MDx）とも称される核酸ハイブリッド形成検定として具現され得る。

【0079】

本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティは、現在のバイオチップ技術の配列サイズに匹敵する配列で、但し、現在のバイオチップ技術により現在において利用可能な感度よりも相当に高い感度、ならびに、ハイブリッド形成動態の並列検出の機能を備えて作製され得ることから、本発明の共鳴式光キャビティ配列もまたバイオチップの代わりに使用され得る。

【0080】

共鳴式光キャビティを含むバイオセンサの感度

スラブ導波路と円筒状キャビティの配列との比較

概略的な例示的計算を行うと、従来のスラブ導波路を含むバイオセンサの単位面積当たりの感度と比較した場合の、本発明の円筒状共鳴式光キャビティを備えるバイオセンサの単位面積当たりの高い感度が例証される。この概略的な例示的計算で使用される概算値は、上記光キャビティが635 nmの波長にて約 10^4 のQを有すると仮定している。斯かる光キャビティ内における光子の寿命は約3.4ピコ秒（ps）（ 3.4×10^{-12} 秒）であるが、これは、光子と、共鳴式光キャビティの表面に対して上記捕捉用基質により固定化された分子上の蛍光タグとの間の約500 μm の有効相互作用長、または、約500（ $d_c/2$ ） μm^2 の有効検知面積に帰着する。前記指揮中、 d_c は μm でのキャビティ直径であり、10 μm より小さい。もしこれがこれらの円筒状共鳴式光キャビティの配列の幅ならば、デバイス内におけるキャビティもしくは領域の個数は $L^2/(2d_c)^2$ であり、この場合にキャビティの中心間間隔は $2d_c$ であり、 $2d_c$ はキャ

ビティおよび帯片状導波路により提供される強い側方局限性の故に小さい。

【0081】

スラブ導波路に対する一領域当たりの検知面積は約 $f d^2 \mu\text{m}^2$ であり、但し、検知領域充填割合である f は0.25に等しく、 d は検知領域の直径であり且つ領域の個数は $L^2 / (2d)^2$ により与えられるものとする。

【0082】

故に一領域当たりの同一の感度に対し、本発明の円筒状共鳴式光キャビティは従来のスラブ導波路と比較して約 $1000/d$ の係数の密度優位性を有し、同一の配列サイズでは、上記マイクロキャビティは従来のスラブ導波路と比較して $1000/d$ の感度優位性を有する。

【0083】

これらの単純なスケーリングの論議は、低い被検体濃度を有するが高いスループットを必要とするサンプルを利用するという臨床用途において、本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティの配列が利用されることを示唆している。これらのスケーリングに関する論議は二光子蛍光からまたは二重共鳴キャビティの使用に起因し得る多数の設計要因または増進される感度を考慮していないが、マイクロキャビティ・センサ配列の使用による劇的な優位性は明らかであり、これは多様な生体検知の状況展開において有用であり得る。

【0084】

本発明の教示を取り入れたバルク円筒状キャビティは複数の単層もしくは分析用化学物質によりパターンニングされ得ることから、バルク円筒状キャビティは微細加工された円筒状キャビティの配列と同様の所望特性を有すると確信される。実際、本明細書中で先に記述された種類のバルク円筒状キャビティは、約 $10^6 \sim 10^7$ 程度の Q を有するように設計かつ作製され得る。

【0085】

また、本発明の教示に従い約 10^7 以上程度の Q を有するように、イオン交換導波路表面を備えた小寸ガラス球が設計かつ作製され得ることも期待される。

【0086】

スラブ導波路と比較して強化された量子効率により増大された共鳴式光キャビ

テイの感度

別の例示的計算によれば、強化された量子効率により増大された本発明の円筒状共鳴式光キャビティの感度が例証される。その開示の全体が援用される、*Journal of Lightwave Technology*、第15巻、998-1005 (1997年)におけるE. E. Little、S. T. Chu、H. A. HausおよびJ. -P. Lameの“マイクロリング共振器チャネル低下フィルタ (Microring resonator channel dropping filters)” (以下では“Little”) の表記法を用いると、全体的なキャビティ減衰率は $1/\tau = 1/\tau_e + 1/\tau_d + 1/\tau_i$ と表現され得る。式中、 $1/\tau_e$ は電磁放射線、すなわちパワーが伝播ポートから光キャビティへと共鳴的に結合する割合を表し、 $1/\tau_d$ はパワーが光キャビティから反射ポートへと結合される割合であり、 $1/\tau_i$ は光キャビティ内における吸収および散乱に起因する損失率である。これらの割合は各共鳴モードに対して異なることを銘記されたい。Littleによれば光キャビティの断面と伝播ポートとを通る全体的パワーは次の様に与えられる。

【数1】

$$P_{cavity} = \frac{\nu_k \tau^2}{\pi R \tau_e} P_{inc} \quad P_{trans} = (1 - 2\tau/\tau_e)^2 P_{inc} \quad (1)$$

式中、

【数2】

$$v_g \approx c/n$$

はモード群速度であり、Rは円筒状キャビティの半径であり、 P_{inc} は円筒状キャビティにおける入射パワーである。 $1/\tau_e = 1/\tau_d + 1/\tau_i$ の場合、透過されるパワーがゼロであるということは全ての入射パワーが光キャビティ内に結合することを意味する。 $1/\tau = 2/\tau_e$ と仮定すると、光キャビティのパワーフローは光キャビティのQに関して次の様に表現され得る。

【数3】

$$P_{\text{cavity}} = \frac{\lambda Q}{2\pi R} P_{\text{inc}}, \quad (2)$$

式中、 λ は材料の波長である。この式は、 $\lambda Q / 2\pi R$ の係数で与えられる強い光キャビティの強化に対する可能性を示している。

此处で使用される主な特性は、全ての入射光が進行波共振器内に結合されて量子効率を劇的に増進し得るという事実である。内部パワーは、 $\tau_a \rightarrow \infty$ 且つ $\tau_e = \tau_i$ である2ポート・デバイスにおいて最大化される。蛍光バイオセンサに対して τ_i は、光キャビティ内における回折、散乱および吸収の損失、バイオ選択的な捕捉用基質からの吸収および散乱、および、蛍光タグによる吸収による寄与から成る。もし τ_i が被検体の存在下におけるキャビティ寿命であり、且つ、 τ_i' が、蛍光発色団による吸収の故に τ_i とは異なる所与の被検体親和力密度における寿命であるならば、 $Q \propto \tau_i$ かつ $Q' \propto \tau_i'$ である。被検体の存在下における光キャビティの Q は $1/Q' = 1/Q + 1/Q_{\text{abs}}$ と表現可能であり、式中、 $Q_{\text{abs}} = 1/\lambda \alpha$ は、吸収係数 α を有する蛍光タグの吸収のみによるキャビティ Q である。放出される蛍光放射線の強度は、蛍光タグ内へ吸収されるパワーの割合として定義される量子効率に比例するが、この量子効率は共鳴キャビティに対し、

【数4】

$$\eta_{\text{cav}} = \frac{Q'}{Q_{\text{abs}}} = \frac{1}{1 + Q_{\text{abs}}/Q} = \frac{Q}{Q_{\text{abs}}} \quad (3)$$

と表現され得る。これは新たな成果である。中央の表現は明らかに、高い Q を有する光キャビティが使用された場合に増進される量子効率を例示している。

これと対照的に、スラブ導波路センサの長さ L に対して量子効率は、

【数5】

$$\eta_{\text{wg}} = 1 - e^{-\alpha L} = \alpha L \quad (4)$$

である。両方の場合において上記近似は小さな α に対して有効であるが、これは低濃度検出においては常にそうであり、且つ、上記円筒状共鳴式光キャビティおよびスラブ導波路の夫々の垂直局限モード・プロファイルは同一であることが仮定

され、その結果、吸収領域に対するエバネッセント場の重複に依り、有効吸収係数は同一である。

上記量子効率の増進率は $Q/\alpha L Q_{\text{res}} = \lambda Q/L$ であり、厳密に上記共鳴式光キャビティの有効長である長さ $L = Q\lambda$ を導波路センサが有するときに各量子効率が等しくなる。(キャビティの円周に等しい)長さ $L = 2\pi R$ のスラブ導波路領域に対し、同一の円周を有する円筒状共鳴式光キャビティは、式(2)により予測されたのと同じである $\lambda Q/2\pi R$ の係数だけ増進された量子効率を有する。故に、本発明の円筒状共鳴式光キャビティと同一の量子効率を有するために、従来のスラブ導波路は比較的長寸とされねばならない。

【0087】

共鳴式光学的センサの増大した感度の優位性

本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティは、1) バルクキャビティを用いた単一もしくは少数の被検体の高感度検出と、2) マイクロキャビティ配列を用いた多数の被検体の高スループット検出との2つの検知状況展開において最適に活用され得る。

【0088】

第1の場合、約1mm～約10mmの直径を有するバルク円筒状キャビティのモードは約 10^6 のQを有し得ると共に、スラブ導波路では非実用的である長さ $L = 0.5\text{m}$ (材料波長 $\lambda = 0.5\mu\text{m}$ とする) の従来のスラブ導波路センサと等しい量子効率を有する。故に、スラブ導波路と略々同一の面積を有するバルク円筒状キャビティはスラブ導波路の量子効率の約100倍の量子効率を有し、約10の係数(すなわち、約1桁の大きさ)の感度優位性に繋がる。結果として、本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティによれば低い被検体濃度を有するより小さなサンプルサイズが検定され得る。

【0089】

約 $50\mu\text{m}$ 以下の直径を有し得る更に小寸の微細加工円筒状キャビティに対しても同様の論議が当てはまる。微細加工円筒状キャビティが約 10^4 のQを有すると仮定すると、これに等しいスラブ導波路の長さは約5mmであり、実用的サイズではある。しかし、その小さなサイズの故に上記微細加工円筒状キャビティ

は円筒状キャビティの稠密配列内に含まれ得る。故に、相当に大寸のスラブ導波路と少なくとも同一の感度を有して、多数のハイブリッド形成反応が同時に行われ、検出され得る。

【0090】

本発明は更に、例示のために提供されると共に如何なる意味でも本発明の限定を意図しない以下の各実施形態において更に詳述される。

当業界において公知である標準的な技術または以下において詳細に記述される技術が利用される。

【0091】

実施例1

光学的マイクロキャビティの開発

本発明の教示を取り入れた共鳴式光キャビティの質量感度の決定において、これらの共鳴式光キャビティの単位面積当たりの感度を表す較正曲線を生成して、BIAコア表面－プラズモン共鳴装置などの公知の質量検知装置の感度と比較し得る。

【0092】

先ず、大きな直径（約25～50 μ m）の円筒状キャビティを用いて考察を行う。キャビティのFSR、Qおよびモード構造に影響する多くの設計パラメータが在る。このパラメータ空間は先ずFDTDシミュレーションを用いて吟味される。

【0093】

最適化された設計パラメータが求められたとき、上記円筒状キャビティが作製される。目的の蛍光タグの吸収帯域上での調整機能を有するレーザ・ダイオードと高感度の光受信器とを用い、円筒状キャビティのキャビティ自由スペクトル領域（FSR）およびQを測定し、FDTDシミュレーションにより求められた結果と比較する。

【0094】

次に、小寸の円筒状キャビティが微細加工され得る。再び、特性記述およびシミュレーションからのフィードバックによりリソグラフおよび作製の各工程が導

かれ、所望の高いQを有する円筒状共鳴式光キャビティが得られる。

【0095】

実施例2

核酸プローブ検定

適切なデバイス特性を与えた後、核酸検定の考察を実施する。核酸プローブが選択されるのは、本明細書中において先に開示されたバイオセンサの微細加工配列の実施形態の高スループット機能から核酸プローブが最も利益を得ると思われるためである。核酸ハイブリッド形成に対しては、T3 RNAポリメラーゼ・プロモータ部位がモデル系である。これらの合成は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて人間のDNAから増幅された単一鎖（single-stranded）のオリゴヌクレオチドによく似ている。また、T3は最小限の臨床的関連性を有する一方、T3ハイブリッド形成プロセスは良好に特性記述されて初期考察に対し理想的な基線の役割を果たすものであって、臨床的関連性のある検定に対しては容易に外挿され得るものである。

【0096】

捕捉用オリゴヌクレオチド（基礎考察に対してはT3）は、単純なパドル・コーティングを用いてほぼ平坦な表面に対してニュートラアビジンを被覆し、そのニュートラアビジン被覆表面に対してビオチン化T3を固定化することにより、SiON円筒状キャビティのほぼ平坦な表面に対し固定化される。上記捕捉用オリゴヌクレオチドは、該捕捉用オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する“アンチ-T3”と称される既知濃度の相補オリゴヌクレオチドを含む溶液に晒される。T3配列および相補的なアンチ-T3配列に対するオリゴヌクレオチド・プライマは、市販されており既に蛍光標識されている。

【0097】

ハイブリッド形成動態は、本明細書中で先に記述された質量、蛍光、または、二光子吸収検知技術を用いて識別（interrogate）され得る。T3およびアンチ-T3の間における結合のハイブリッド形成動態は、上記円筒状キャビティ・モードのエバネッセント場により精査され、その場合に励起放射線は、約1分間の周期時間間隔で約5分間にわたる検出に対し約10乃至約15秒だけ

ストローブされる。バイオセンサの特性に依存する定数となるまでのハイブリッド形成の速度は、円筒状キャビティの各照射により求められた測定値に基づき決定される。“センサ利得係数 (sensor gain factor)” と称される上記定数は、従来のスラブ導波路よりも微細加工円筒状キャビティを含むバイオセンサに対する値が相当に大きく、且つ、本発明の共鳴式光キャビティの分析感度を増大する。

【0098】

これらの測定は、アンチ-T 3 の濃度の対数的進展に対して反復されることから、上記分析感度は標準曲線に対して計算され得る。上記質量、蛍光および二光子吸収検知方法の各々は同一群の基準溶液を用いて行われることから、これらの検知方法の各々の分析感度は相互に、且つスラブ導波路技術に対して比較され得る。

【0099】

実施例 3

単一共鳴および二重共鳴の光キャビティ間の比較

単一共鳴キャビティと比較して増進された二重共鳴式光キャビティの感度検出を例証する上では、1) 温度を下げた操作と、2) 強く広がらない染料の使用との2つの手法が使用され得る。

【0100】

第1の場合において、Cy 5 の蛍光収率が77° Kまでの温度に対して測定される。温度が低下するにつれ、占有されたフォノンレベルの個数は減少し、不均一線幅 (inhomogeneous linewidth) が狭幅化される。

【0101】

第2の手法は、異なる種類の染料を使用する。たとえばB-フィコエリトリンは、約20 nmのスペクトル幅により575 nmに放出ピークを有する。広幅吸収ピークは約546 nm (これは依然として、532 nmにて二重化Nd:YAGレーザにより効率的に利用され得る) に集中し、その結果、二重共鳴はFSR 42 nmにより575 nmおよび532 nmにて獲得されると共に全ての蛍光はキャビティ・モードに結合し、蛍光の半分未満がキャビティ内に結合すると仮定

すると、期待される増進率は約2である。但し、吸収および放出のスペクトルは、キャビティ内への蛍光が蛍光タグにより再吸収されるように重複する。

二重共鳴式光キャビティのこの“光子リサイクル”効果は、増進された自然放出の考察のみにより予測されるよりも大きな蛍光収率の増進を提供する。

【0102】

実施例4

蛍光検知が用いられたときに得られる感度

非特異的な結合から生ずる問題と、（とくに小寸分子に対して）質量検知は蛍光検知ほど敏感でないという事実に依り、蛍光の考察も実施する。この検定において、被検体は、Cy5 蛍光タグにより蛍光的に標識される。キャビティ光モードのエバネッセント場は蛍光タグからの蛍光を誘起し、その場合、円筒状キャビティの高いQは円筒状キャビティの円周より相当に長い有効経路長をもたらす。キャビティのクラッド（すなわち捕捉用基質）の広い面積から上方に放出される蛍光の検出を用いると、ピコモルの感度が可能である。本発明の微細加工円筒状キャビティのほぼ平坦な表面の面積は 0.001 mm^2 以下程度であることから、単位面積当たりの感度は、匹敵する感度を有する従来のスラブ導波路に対するよりも相当に大きい。

【0103】

これらの考察は、5' 末端で標識された開始プライマを用いたPCRプロセスの間に生成されるであろうように、Cy5 により5' 末端にて標識された標識オリゴヌクレオチド、アンチ-T3を用いて実施される。Cy5は、大きな数値（figure）のメリット（すなわち、吸収係数と収率蛍光量子収率とを掛け合わせたもの）を有すると共に、約649 nmの励起放射線を発する安価なレーザー・ダイオードにより利用可能なピーク吸収を有する。蛍光ピークは670 nmにおける赤色に存在する。

【0104】

上記デバイスの頂部から発せられた蛍光（文献によるといわゆる“側部”放出）は低ノイズの光受信器上へと作像される。該受信器の感度は、1（unity）の信号／ノイズ比を得るに必要な最小平均受信パワーとして定義される。受信

されるパワーは、作像用光学機器、上記キャビティ内に蓄積される光エネルギー、および、被検体の親和力濃度の関数である。此処でも、単位面積当たりの感度が決定され、平面的なスラブ導波路を用いて為される測定値と比較される。必要に応じて、pM状況に対するキャビティ表面積の感度を増大するために付加的なキャビティ最適化が行われる。

【0105】

非特異的結合に対するこの検知機構の応答もまた決定されねばならない。この場合にハイブリッド形成速度は、質量検知に関して述べられたのと同様にして非特異的結合に対し、且つ、付加的な不整合の状況に対して測定される。これらの結果は、スラブ導波路の結果と異なるものではない。再び、優れた感度による高スループットが達成される。

【0106】

実施例5

高スループット・スクリーニング

1 cm² 面積の基板上に (10 μm 直径のキャビティにより) 500×500 配列の微細加工円筒状キャビティを載置することは可能であるが、最初は、高スループットの臨床的スクリーニング用途に対する機能を例証するために 4×5 配列を作製する。縮小した配列サイズは、捕捉用基質の作製および異種 (heterogeneous) パターンニングを簡素化すると共に、要求される標識オリゴヌクレオチドの個数を減少するために使用される。

【0107】

簡素化のために、4×5 キャビティ配列を用いた最初の考察は均質な単層パターンニングにより実施される。これは、相補的な合成オリゴヌクレオチド溶液が各円筒状キャビティの表面にてハイブリッド形成することを意味する。

【0108】

次の工程は、異種パターンニングである。これらの考察、すなわち HIV-1 のために選択されたモデル系は、相当の臨床的関連性を有する。HIV-1 は約 18 種の亜型すなわち遺伝子型を有することが公知であり、これは微細加工配列技術の可能性を明確に例証し得るものである。上記円筒状キャビティのほぼ平坦

な表面上に対しては、これらの18種の遺伝子型の各々に対して相補的である合成オリゴヌクレオチドから成る捕捉用基質が“スタンピング (stamping)”によりパターンニングされる。スタンピングは、微小ピペットの配列を用いて捕捉用基質を堆積する。

【0109】

2つの円筒状キャビティのほぼ平坦な表面は、ニュートラアビジンのみによりパターンニングされる。これらの2つのキャビティは基準の役割を果たすと共に、非特異的結合の速度を示す。

【0110】

各円筒状キャビティの表面は次に、上記の18種の合成オリゴヌクレオチドを既知の組合せおよび濃度で含むサンプル被検体溶液に露出される。

各円筒状キャビティの表面における蛍光放出は、CCD配列を用いて実質的に同時に測定され、応答における均一性を決定する。もし応答が相当に非均一であれば、光分配ネットワークは再設計される。

【0111】

再び、この実施例は、個々のハイブリッド形成速度を示し、ウイルス負荷を評価し、且つ、複数の非特異的結合プロセスの存在下においても依然として高感度検出が実施され得ることを例証する。

【0112】

実施例6

バルク円筒状キャビティの開発

図3に関して本明細書中で先に記述されたように本発明の教示を取り入れたバルク円筒状キャビティは、狭幅線調整可能なレーザ・ダイオードから発せられた電磁放射線を、精密多軸ステージ上に取り付けられた（たとえば、側部研磨され又は角部研磨された光ファイバなどの）伝播ポートを介して該バルク円筒状キャビティ内に共鳴的に結合することで検査かつリファインされ得る。故にレーザ・ラインは、各レーザにより獲得される中央周波数およびQ値が測定され得るように、共鳴をトレースするために掃引され得る。更に、これらの測定の間においては（たとえば第2光ファイバなどの）反射ポートが使用され、伝播ポートおよ

び該反射ポートからのデータにより理論との比較が促進される。上記反射ポートは円筒状キャビティのQすなわち内部キャビティ・パワーを減少するが故に円筒状キャビティの量子効率を減少することから、生体検知考察の間において上記反射ポートは省略され得る。

【0113】

約5mmの直径を有するバルク円筒状キャビティに対し、 $0.5\mu\text{m}$ の波長の励起放射線における各方位モード (a z i m u t h a l m o d e) 間のFSRは約13GHzである一方、 10^6 のQに対して共鳴線幅は600MHzである。これらの値は十分に、市販の調整可能レーザ・ダイオードの調整範囲および長期周波数安定性の範囲内である。このサイズ (すなわち約5mmの直径) の円筒状キャビティに対する (数千もの) 多数の半径方向モードに依り、個々のモードは各共鳴線幅の強い重複により解像不可能となり得る。所定モードの周波数および方位モーメントの両者が効率的な励起に整合しなければならないので、結合用ファイバの研磨により、どのモードが観察され得るかが決定される。どのモードが励起されるかは理論に対して詳細な比較を行うことにより制御されるが、これは重要な問題である、と言うのも、蛍光による生体検知に対しては大きな面積有効範囲 ($1 \gg 0$) を有する高Qモードが望まれるからである。最適化によって、約 10^6 のQおよび大きな表面積共鳴を有する円筒状キャビティが獲得され得ると期待される。

【0114】

実施例7

バルクキャビティによるイムノアッセイ

上記バルク円筒状キャビティの實質的に平面的な検知表面上には、E、c o l i O 1 5 7 : H 7 に対して特異的であるモノクローナル抗体を備えた捕捉用基質が物理的に吸着される。この捕捉用基質単層は上記円筒状キャビティの共鳴をそれほど阻害するとは思われないが、この予測を確認するために付加的な測定が行われる。

【0115】

上記被検体 (すなわちE、c o l i O 1 5 7 : H 7) は、nを試行番号とし

てC₀の濃度を有する溶液内で調製され、上記捕捉用基質と特異的に結合される。

【0116】

上記捕捉用基質と被検体とのハイブリッド形成に続き、E. coli Q157:H7に特異的に結合する（Cy5-標識された）モノクローナル・トレサ抗体を用いて蛍光発色団が導入される。Cy5は、649nmに吸収ピークを有する指示薬染料であり、蛍光標識として一般的に使用される。10⁶個までのトレサ抗体がバクテリアに結合し得、これは、単一DNA鎖を標識して増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を要するという分子診断検定に対して、多価抗原によるイムノアッセイの1つの利点である、と言うのも、単結合バクテリアの蛍光検出が可能だからである。上記キャビティの頂部からの蛍光放出は低ノイズの光検出器上へと作像されるが、信号強度は結合した被検体の濃度および光学的励起パワーに比例する。

【0117】

これらの考察において根本的に重要なパラメータおよび比較が為され得るパラメータは溶液内の被検体の濃度であり、これは上記捕捉用基質により結合される被検体の濃度に比例する。

【0118】

本発明に係る共鳴式光キャビティを用いると、バイオチップに匹敵する配列サイズが達成され得る一方、低い被検体濃度の検出を促進するために検知領域当たりの高感度が維持される。本発明の共鳴式光キャビティは、実質的に同一の表面積を有する平面的スラブ導波路により獲得可能な感度よりも約10倍以上も大きな感度を有すると確信される。

【0119】

本発明の共鳴式光キャビティはまた、導波路センサの（ハイブリッド形成の動態に対する）リアルタイムで（高スループットに対する）並列な読み取りを行う重要な機能も有する。

【0120】

上記の説明は多くの詳細を含むが、これらは本発明の範囲を制限するのでは無

く、現在において好適な実施形態の幾つかを例示するものと解釈されるべきである。同様に、本発明の精神もしくは範囲から逸脱することなく、本発明の他の実施形態が案出され得る。また個々の実施形態の特徴は、組合せて用いられ得る。故に本発明の範囲は、上記の説明では無く添付の請求の範囲およびその法的均等物によってのみ表現かつ限定される。本明細書中で開示された発明に対し、請求の範囲の意味および範囲内の全ての付加、削除および改変は該請求の範囲により包含される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 微細加工された円筒状共鳴式光キャビティを含む本発明のバイオセンサの実施形態の概略図。

【図1A】 図1に示された共鳴式光キャビティを微細加工する方法を概略的に示す図。

【図1B】 図1に示された共鳴式光キャビティを微細加工する方法を概略的に示す図。

【図1C】 図1に示された共鳴式光キャビティを微細加工する方法を概略的に示す図。

【図1D】 図1に示された共鳴式光キャビティを微細加工する方法を概略的に示す図。

【図1E】 図1に示された共鳴式光キャビティを微細加工する方法を概略的に示す図。

【図1F】 図1に示された共鳴式光キャビティを微細加工する方法を概略的に示す図。

【図2A】 共鳴式光キャビティの配列内に含まれた図1の各共鳴式光キャビティに対して伝播ポートが電磁放射線を供給し得る代表的様式を示す概略図。

【図2B】 共鳴式光キャビティの配列内に含まれた図1の各共鳴式光キャビティに対して伝播ポートが電磁放射線を供給し得る代表的様式を示す概略図。

【図3】 バルク円筒状共鳴式光キャビティを含む本発明のバイオセンサの別実施形態を概略的に示す図。

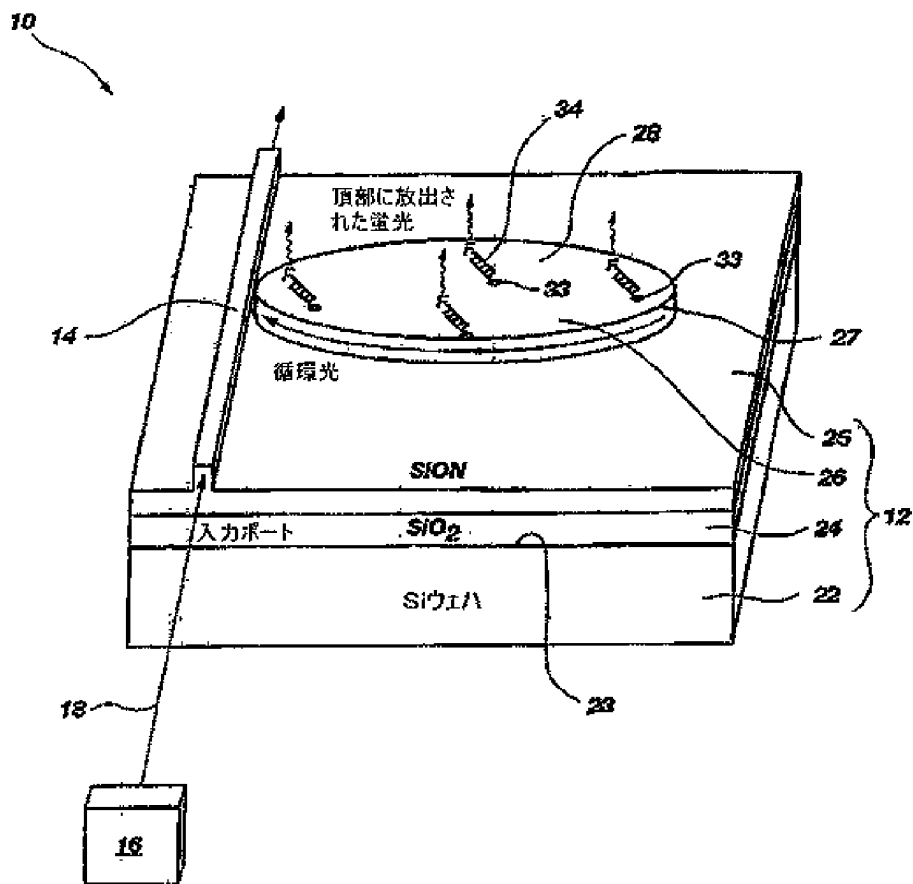
【図3A】 図3に示された共鳴式光キャビティを作製する方法の概略図。

【図3E】 図3に示された共鳴式光キャビティの表面に対する複数の異なる検知領域の包含を概略的に示す図。

【図4】 本発明の教示を取り入れた球状共鳴式光キャビティの概略図。

【図5】 質量検知技術を促進するために図1に示されたバイオセンサを備えた反射ポートの用法を示す図。

【図1】



【図1A】

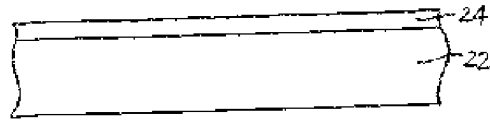


FIG. 1A

【図1B】

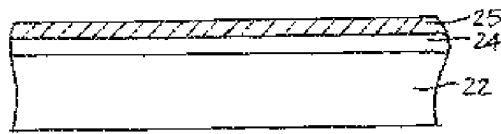


FIG. 1B

【図1C】

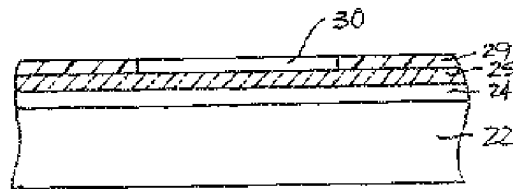


FIG. 1C

【図1D】

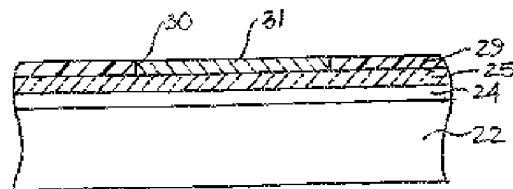


FIG. 1D

【図1E】

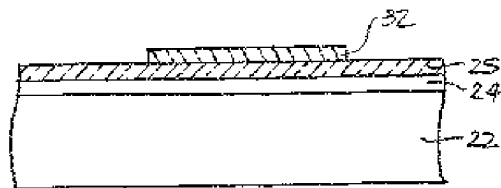


FIG. 1E

【図1F】

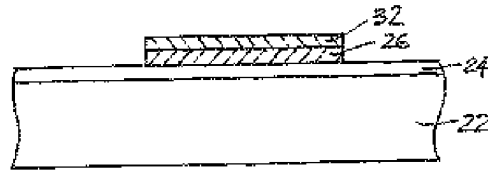


FIG. 1F

【図2A】

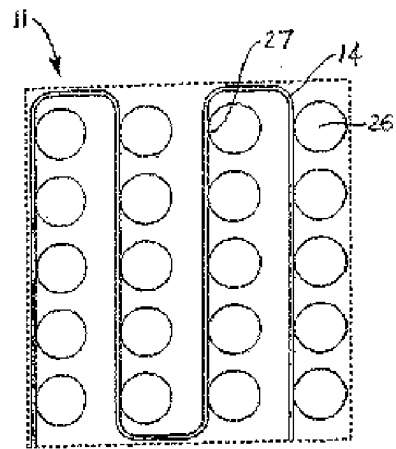


FIG. 2A

【図2B】

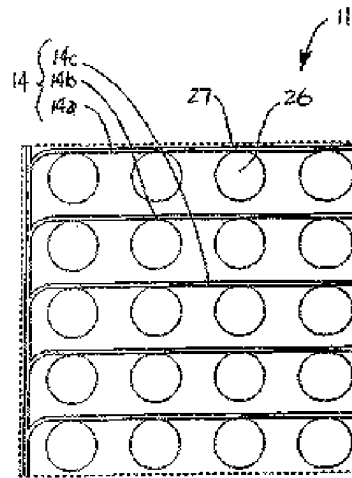


FIG. 2B

【図3】

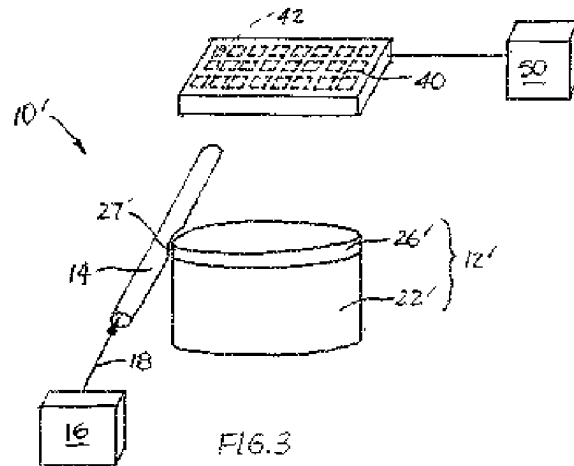


FIG. 3

【図3A】

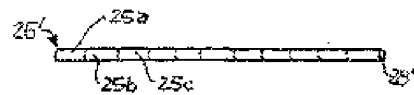


FIG. 3A

【図3B】

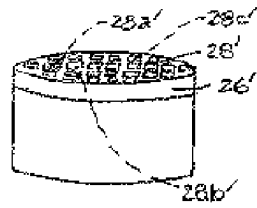


FIG. 3B

【図4】

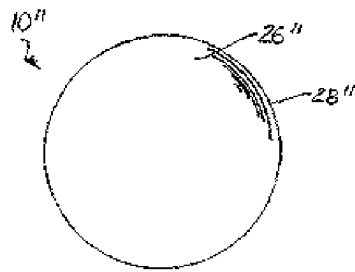


FIG. 4

【図5】

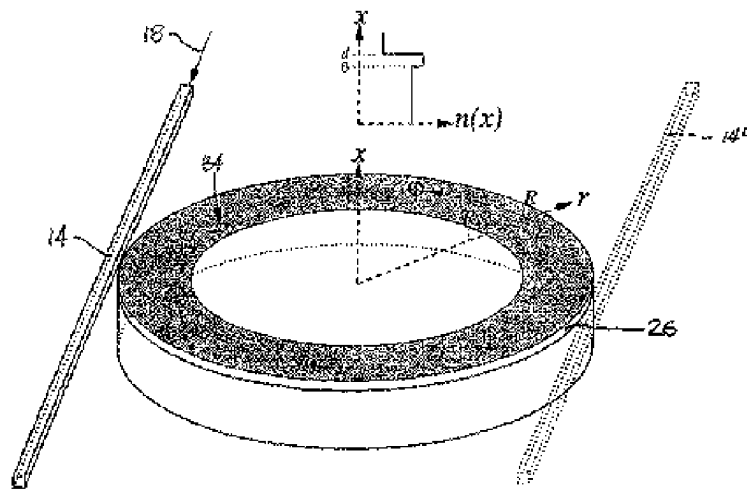


FIG. 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US00/41138
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/543 US CL : 438/518 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,244,636 A (WALT et al) 14 September 1993 (14.09.1993), see entire document.	1-30
A	US 5,525,466 A (SLOVACEK et al) 11 June 1996 (11.06.1996), see entire document.	1-30
A,P	US 6,210,910 B1 (WALT et al) 03 April 2001 (03.04.2001), see entire document.	1-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See page 30a/b's annex.		
* Special categories of cited documents: (A) : documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance (B) : earlier documents published on or after the international filing date (C) : documents which may have priority claims or which are cited in substantiating the priority claim of another document or have been previously cited (D) : documents relating to the art of the invention or to its field (E) : documents which are cited in the international search report and which are not of the prior art category		
(A) : documents published after the international filing date or priority date and are in English with the exception that cited to substantiate the priority or claims concerning the invention (B) : documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account (C) : documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account along with prior art documents (D) : documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account along with prior art documents (E) : documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account along with prior art documents		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
03 JUNE 2001		18 SEP 2001
Name and mailing address of the ISA/US Communications Patent and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531		Assigned to CHRISTOPHER CHEN
Facsimile No. (703) 305-2230		Telephone No. (703) 305-6196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

[International application No.
PCT/US00/11132]

9. FIELDS SEARCHED

Majority: Documentation searched

Classification System: U.S.

368/12, 129, 390, 121;

412/58, 82.05, 82.08, 82.09, 82.11;

432/287.1, 287.2, 288.7, 398;

436/164, 165, 172, 518, 524, 537, 539, 545

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F i	キーワード(参考)
G01N 37/00	103	G01N 37/00	103

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA04 EA01 GA03
GB05 HA05 KA01 KA02 KA09
LA03
2G059 AA01 BB12 CC16 DD13 EE01
EE07 GG01 HH02 HH06 JJ17
KK01 PP01